

## ИЗУЧЕНИЕ ХИТИНОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА VIBRIO CHOLERAЕ O139

*Б.Н. Мишанькин, Н.Я. Шиманюк, С.О. Водопьянов,  
А.С. Водопьянов, О.В. Дуванова*

ФГУЗ научно-исследовательский противочумный институт,  
Ростов-на-Дону, E-mail: [plague@ic.ru](mailto:plague@ic.ru)

## THE INVESTIGATION OF THE VIBRIO CHOLERAЕ O139 CHITINOLYTIC COPLEX

*B.N. Mishankin, N.Y. Shimanyk, S.O. Vodopyanov,  
A.S. Vodopyanov, O.V. Duvanova*

Research Institute for Plague Control, Rostov-on-Don, E-mail : [plague@ic.ru](mailto:plague@ic.ru)

### ABSTRACT

Chitinase complex enzymatic activity of 18 strains of *Vibrio cholerae* O139 isolated from clinical and environmental sources was studied. All the strains were capable of growing on synthetic media with ground chitin without any other nitrogen source, specific chitinase activity being 10–600 mcg N-acetyl-D-glucosamine/ mg of protein. Six chitinase genes were identified and localized using the computer analysis of the available genome sequences from *Vibrio cholerae* eltor (Heidelberg et al., 2001). For their testing with the help of polymerase chain reaction (PCR) specific primers were designed. It was found that all the clinical strains as rule contained genes of six enzymes, although strains isolated from water lost half of them including well-studied gene VC 1952 (ChiA, mol. wight – 88.7 kDa). However water strains of vibrios non the less expressed their chitinolytic activity at a high level apparently at the expense of compensatory action of others gene.

*Vibrio cholerae* – этиологический агент тяжелого диарейного заболевания, называемого холера, VII пандемия которой продолжается уже более 30 лет, вплоть до наших дней. Вызванная вибрионами O1 серогруппы, она в 1992 г. приобрела смешанный характер благодаря мощным эпидемическим вспышкам холеры в Индии и Бангладеш, обусловленным появлением вибрионов нового серовара – *V. cholerae* O139. Показано, что персистенция вибрионов в условиях водного окружения повышается благодаря их способности гидролизовать хитин и колонизировать в этой связи разные хитинсодержащие субстраты, включая наружные покровы представителей зоопланктона (копеподы, амфиподы и др.) (Lipp E. et al., 2002). Прикрепление, выживаемость и пролиферация возбудителя на поверхностях небольших ракообразных хорошо документированы, прилипание же бактерий, как показано Tarsi R и Pruzzo C. (1999), способствует выживанию даже так называемых живых, но некультивируемых форм. Результатом подобных исследований явилось предположение о том, что как типичные, так и измененные формы холерного микроба в специфической ассоциации с представителями зоопланктона являются наиболее вероятным резервуаром, где *V. cholerae* O1 наряду с другими *Vibrio* spp. образуют хитиназы, ответственные за деградацию хитина до растворимых олигосахаридов. Прямая связь между прикреплением вибрионов O1 серогруппы к поверхностям хитина и заболеванием человека была показана Nalin D. et al. (1979). Они же обнаружили способность хитина защищать вибрионы от летального действия низких значений pH желудка, а Bassler B. et al. (1991) продемонстрировали проявление положительного хемотаксиса микробов к продуктам гидролиза хитина. Весьма впечатляют расчеты Colwell R. et al. (1996) о том, что одна копепода может нести на своей поверхности от  $10^4$  до  $10^6$  клеток *V. cholerae* и тогда случайное проглатывание нескольких копепод с необеззараженной питьевой водой может привести к заболеванию холерой, которая является дозо-зависимой (около  $10^4$  м.к.) инфекцией.

Компьютерный анализ полной нуклеотидной последовательности хромосом вибриона эльтор (Heidelberg et al., 2001) показал присутствие в его геноме минимум шести хитиназ. Три из них с мол. массами 63, 118 и 89 кДа локализуются на первой хромосоме, а три других с мол. массами 90, 54 и 112 кДа — на второй. На пять генов были сконструированы праймеры, позволившие контролировать их присутствие на хромосоме конкретного штамма с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В работе представлены результаты изучения суммарной хитинолитической активности у клеток 18 случайно отобранных штаммов *Vibrio cholerae* O139, выделенных из клинических проб (9 штаммов, ctxAB+tcpA+) и из проб воды открытых водоемов (9 культур, ctxAB-tcpA-). В качестве своеобразных контролей использовали штаммы *V. cholerae* eltor 5879 (ctx AB+tcpA+) и *V. cholerae* class. 569B (ctxAB+tcpA+), а также *Escherichia coli* QD 5003, *Yersinia pestis* ЖБР-19 и *Y. pseudotuberculosis* 1993. Активность тестировали качественно по образованию ореолов просветления на плотной синтетической среде (рН 7,2) с добавлением в качестве единственного источника углерода 0,5–1,0% коллоидного хитина из панциря крабов. В некоторых случаях использовали выделенный модифицированным методом Дж. Бемиллера (1967) хитин из корма для аквариумных рыбок, приготовленного на основе высушенных дафний (*Daphne* spp.).

В случае количественного определения хитинолитической активности клетки штаммов выращивали в течение 6 суток при 37°C со встряхиванием в жидкой синтетической (солевой) среде (рН 7,6) с 0,5% молотого хитина. Бактерии отбрасывали центрифугированием, культуральную жидкость концентрировали сульфатом аммония (70% насыщения) и после диализа использовали в качестве источника ферментативной активности. О гидролизе хитина судили по образованию N-ацетил-D-глюкозамина с помощью реакции Элсона-Моргана (1967). Белок определяли по Лоури. Активность комплекса выражали в мкг N-ацетил-D-глюкозамина / мг белка.

Тонкослойную хроматографию проводили на пластиках Silufol (Чехословакия). Для разделения аминсахаров использовали систему растворителей изопропанол — вода (9:1), а хроматограммы окрашивали 0,5%-ным раствором реактива Эрлиха.

Все исследованные штаммы вибрионов обладали способностью гидролизовать хитин, на которую влияли условия культивирования (состав среды, ее рН, температура и продолжительность выращивания). Засеянные “пяточком” на плотной среде с хитином, они образовывали зоны просветления разной величины на 2–3 сутки роста и проявляли чувствительность к индикатору бромтимоловому синему (0,008%). В этих условиях у представителей иерсиний и кишечной палочки активность не проявлялась.

На хроматограммах доминирующим продуктом гидролиза был N-ацетил-D-глюкозамин, хотя на них регистрировали окрашивающиеся р-диметиламинобензальдегидом пятна, возможно, являющиеся олигосахаридами с разной степенью полимерности. Удельная активность ферментного комплекса у токсигенных штаммов *V. cholerae* O139, выделенных от людей, колебалась в пределах 10,4–508 (в среднем 149,3), а у выделенных из воды нетоксигенных — 23–600 (в среднем 266,9) мкг N-ацетил-D-глюкозамина/мг белка. Активность у вибрионов 5879 и 569B в тех же условиях составляла 153 и 332 мкг N-ацетил-D-глюкозамина/мг белка соответственно. В то же время ПЦР-анализ ДНК хромосом показал, что у штаммов водного происхождения отсутствуют в интактном состоянии, как минимум, гены трех хитиназ VC 1073, хорошо изученного VC 1952 (ChiA) (I хромосома, мол. масса 118,4 и 88,7 кДа), а также VCA 0811 (II хромосома, мол. масса 53,6 кДа), что можно рассматривать как следствие обширных хромосомальных перестроек в результате длительного пребывания штаммов в водном окружении (Мишанькин Б.Н. и др., 2000, 2004).

Согласно данным литературы (Бабенко А.Ю. и др., 1999, 2000), хитинолитические комплексы *Vibrio* sp.X по типу действия на субстрат включают экзо- и эндохитиназы, что повышает суммарную активность препаратов вследствие увеличе-

ния числа концевых групп из-за фрагментации хитина. Возможно, спонтанная утрата в нашем случае нескольких хитиназ обуславливает компенсаторное усиление экспрессии генов оставшихся, что способствует выживанию вибрионов в конкретных экологических условиях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабенко А.Ю., Шелегедин В.Н.* Биотехнология. 1999. 5. 11–18.
2. *Бабенко А.Ю., Шелегедин В.Н.* Биотехнология. 2000. 1. 39–45.
3. *Бемиллер Дж.Н.* Хитин // Методы химии углеводов / Под ред. L. Whister and M. Wolfrom. М.: Мир, 1967. 340–342.
4. *Мишанькин Б.Н., Романова Л.В., Ломов Ю.М. и др.* // Журн. микробиол. 2000. 3. 3–7.
5. *Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Ломов Ю.М. и др.* // Журн. микробиол. 2004. 1, 29–34.
6. *Bassler B.L., Gibbons P.J., Yu C. et al.* // J. Biol. Chem. 1991. 266, 24268–24275.
7. *Colwell R., Brayton P., Harrington P. et al.* // World L. Microbiol. Biotechnol. 1996. 12, 28–31.
8. *Heidelberg J.F., Eisen J.A., van Zeeuwen W. et al.* // Nature. 2000, 406, 477–483.
9. *Lipp E.K., Huq A., Colwell R.R.* // Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15, 4, 757–770.
10. *Nalin D.R., Daya V., Reid A. et al.* // Infect. Immun. 1979, 25, 2 768–770.
11. *Tarsi R., Pruzzo C.* // Appl. Env. Microbiol. 1999, 66, 3, 1348–1351.